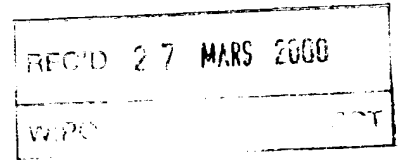


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

4

E P 99/9067

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



## Bescheinigung

09/85

Das Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Freiburg/Deutschland hat eine  
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Hyperforin als Zytostatikum"

am 24. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen  
Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
A 61 K 31/12 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Dezember 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 13 333.6



24. März 1999  
K/T/Me

Klinikum der Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg  
Hugstetter Str. 49  
79106 Freiburg

---

### Hyperforin als Zytostatikum

---

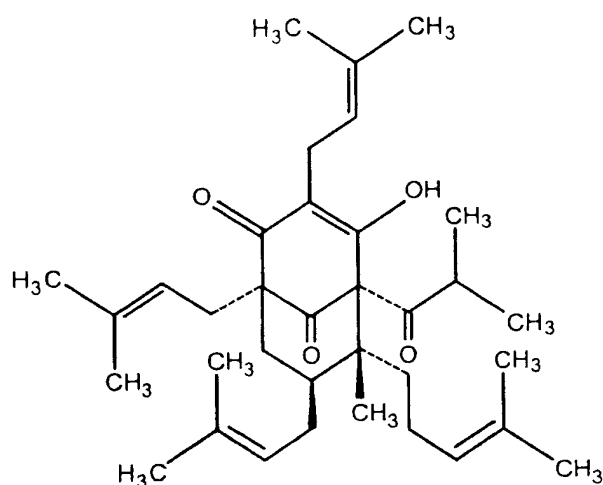
Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Hyperforin als Zytostatikum.

Hyperforin zählt neben den Hyperizinen zu den charakteristischen Inhaltsstoffen des Johanniskrauts (*Hypericum perforatum* L.). Johanniskraut und Johanniskrautauszüge werden schon seit geraumer Zeit in der Medizin und der Volksmedizin als Arzneimittel für verschiedenste Indikationen eingesetzt.

Die Monographie "Hyperici herba (Johanniskraut)", die von der Kommission E des früheren Gesundheitsamtes am 5.12.1984 publiziert wurde, nennt als Anwendungsgebiet für *Hypericum*-Präparate (intern als Tropfen oder Tabletten): "Psychovegetative Störungen, depressive Verstimmungszustände, Angst und/oder nervöse Unruhe". In zahlreichen plazebokontrollierten Studien wurde die den trizyklischen Antidepressiva vergleichbare antidepressive Wirksamkeit des Johanniskrauts belegt.

Als Hausmittel wird insbesondere das Johanniskrautöl zur Wund- und Schmerzbehandlung und bei Verbrennungen eingesetzt. Eine entzündungshemmende Wirkung des Johanniskrautöls wird ebenfalls beschrieben (L. Roth, Hypericum, Hypericin, Ecomed Arzneipflanzen-Monographie, Ecomed, Landsberg/Lech 1990).

Einer der wirksamen Bestandteile des Johanniskrautöls ist Hyperforin (P. Maisenbacher et al., Planta Med. 58:351-354 (1992)), dessen Formel im folgenden wiedergegeben ist:



Hyperforin hat als Wirkstoff Interesse als antidepressive Substanz erweckt (Pharmacopsychiatry 1998, Vol. 31, Supplement 1, Seiten 1-60). Darüberhinaus ist Hyperforin antibakteriell wirksam (A. I. Gurevich et al., L. Antibiotiki, 16:510-513 (1971)).

Zytostatika hemmen das Wachstum von insbesondere schnell wachsenden Zellen, wie sie in Tumoren und Leukämien vorliegen. Daher eignen sie sich als Chemotherapeutika gegen Krebs. Zahlreiche Chemotherapeutika sind bekannt, jedoch weisen diese Verbindungen auch Nachteile auf. Insbesondere treten bei der Behandlung mit bekannten Chemotherapeutika starke Nebenwirkungen auf, und die meisten Chemotherapeutika weisen

nur gegenüber bestimmten Tumorzelllinien eine befriedigende Aktivität auf.

Daher besteht weiterhin ein Bedürfnis nach zusätzlichen für die Krebsbehandlung geeigneten Verbindungen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein weiteres Chemotherapeutikum zur Behandlung von Krebserkrankungen zur Verfügung zu stellen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Hyperforin auf Tumorzellen eine proliferationshemmende Wirkung ausübt und Apoptose in Tumorzellen auslösen kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit die Verwendung von Hyperforin zur Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.

Unter Krebserkrankungen werden vorliegend insbesondere maligne Tumore sowie Lymphome und Leukämien verstanden.

Hyperforin ist jedoch auch gegen Metastasen, wie Metastasen des malignen Melanoms (schwarzer Hautkrebs) besonders wirksam.

Hyperforin hat sich auch gegenüber epithelialen Tumoren wie epitheliale Hautkrebs als wirksam erwiesen. Hierbei handelt es sich um einen langsam wachsenden Hautkrebs, der einer topischen Behandlung gut zugänglich ist. Der epitheliale Hautkrebs wird auch Spinaliom, Plattenepithelkarzinom oder Stachelzellkrebs genannt. Darüberhinaus eignet sich Hyperforin zur Behandlung von Krebsvorstufen (Präkanzerosen), wie beispielsweise solaren Präkanzerosen.

In der Praxis ist die Verwendung von Hyperforin insbesondere bei Lymphomen/Leukämien, schlecht operablen Tumoren und für die adjuvante Behandlung von Metastasen wie Melanom-Metastasen interessant. Insbesondere bei dem malignen Melanom zeigen alle bislang hierfür verfügbaren Therapien nur sehr mäßige Erfolge.

Für die Behandlung systemischer Tumore und von Metastasen sollte Hyperforin intravenös verabreicht werden. Für die intravenöse Applikation kann der lyophilisierte oder getrocknete Wirkstoff beispielsweise frisch in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst und sofort injiziert bzw. infundiert werden.

Hyperforin eignet sich aber auch für die lokale Anwendung beispielsweise durch intra- oder peritumorale Injektion oder Instillation (z.B. auch endoskopisch). Hierfür kann der Wirkstoff beispielsweise wie vorstehend für die intravenöse Applikation beschrieben bereitgestellt werden. Vorteilhaft kann der Wirkstoff jedoch auch durch epikutane Applikation beispielsweise in Cremeform angewandt werden, wobei sich diese Anwendungsform beispielsweise zur Behandlung von solaren Präkanzerosen besonders eignet.

Für die lokale, epikutane Applikation kann der Wirkstoff beispielsweise in Ethanol gelöst und in eine fette Salbengrundlage eingearbeitet werden. Diese kann okklusiv (unter Folie) beispielsweise für 24 Stunden auf den Tumor einwirken. Entsprechende Salben und Cremen sind beispielsweise in der DE 198 54 446 offenbart, deren Inhalt durch Bezugnahme in die vorliegende Beschreibung einbezogen wird.

Bei der Aufbereitung des Wirkstoffs muß beachtet werden, daß es sich um eine lichtempfindliche Substanz handelt, die sich leicht zersetzt. Daher muß bei der Gewinnung, Lagerung und Verabreichung auf einen entsprechenden Lichtschutz geachtet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen mit Hyperforin sollte die Hyperforinkonzentration am Wirkort so hoch sein, daß eine antiproliferative bzw. Apoptose-induzierende Wirkung eintritt. Die hierfür notwendige Konzentration kann je nach Art des behandelten Tumors variieren und vom Fachmann leicht bestimmt

werden. Vorteilhaft ist beispielsweise bei intratumoraler Injektion eine Hyperforinkonzentration in der verabreichten Lösung von 50 µg/ml und bei epikutaner Applikation eine Wirkstoffkonzentration von 100 µg/ml. Bei systemischer Anwendung sollte der Wirkstoff in solchen Mengen injiziert werden, daß Plasmaspiegel von mindestens 50 µg/ml erreicht werden. Dies entspricht einer Hyperforinmenge von etwa 5 mg/kg Körpergewicht des Patienten.

Die beiliegende Figur 1 zeigt die proliferationshemmende Wirkung von Hyperforin auf die Tumorzelllinien HT144 (Melanom-Metastase), A431 (epidermoides Karzinom) und Jurkat (leukämisches Lymphom).

Figur 2 zeigt die Fähigkeit von Hyperforin Apoptose in den Tumorzelllinien HT144 (Melanom-Metastase), A431 (epidermoides Karzinom) und Jurkat (leukämisches Lymphom) zu induzieren.

Für die nachfolgenden Beispiele, die die Erfindung näher erläutern sollen, wurde kommerziell erhältliches Hyperforin der Firma HWI Analytik, Rheinzabern, verwendet. Die Reinheit des Hyperforins betrug über 90%. In allen Versuchen wurde das Lösungsmittel DMSO in der maximalen verwendeten Konzentration getestet und zeigte keinerlei Effekte auf Proliferation oder Apoptoserate.

#### Beispiel 1

Zur Untersuchung der proliferationshemmenden Wirkung von Hyperforin auf die Tumorzelllinien HT144 (Melanom-Metastase), A431 (epidermoides Karzinom) und Jurkat (leukämisches Lymphom) wurden die Tumorzellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Vorinkubation der Zellen für 24 h wurde Hyperforin in den in Figur 1 angegebenen Endkonzentrationen zupipettiert. Die Zellen wurden anschließend 24 h unter Zusatz von radioaktivem [3H]-Thymidin (1 µCi) inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Glasfaserplatten geerntet und die inkorporierte

Radioaktivität, die ein Maß für die Neusynthese von DNA ist, wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind in Figur 1 dargestellt.

Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß die Hyperforin-Konzentration, bei der eine 50%-ige Wachstumshemmung der Zellen auftrat ( $IC_{50}$ ), zwischen 5 und 10  $\mu g/ml$  lag.

### Beispiel 2

Dieses Beispiel belegt, daß Hyperforin in Tumorzellen Apoptose, das heißt den sogenannten programmierten Zelltod, induziert. Die Auslösung von Apoptose in Tumorzellen ist für viele Zytostatika charakteristisch und spricht für die Wirksamkeit von Hyperforin als Zytostatikum.

HT144 (Melanom-Metastase), A431 (epidermoides Karzinom) und Jurkat (leukämisches Lymphom) Tumorzellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml in 96-Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Nach Vorinkubation der Zellen für 24 h wurde Hyperforin in den in Figur 2 angegebenen Endkonzentrationen zupipettiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und mit einem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Boehringer, Mannheim) auf niedermolekulare DNA-Fragmente untersucht. Hierzu wurde ein biotinylierter anti-Histon-Antikörper und ein Peroxidase-gekoppelter anti-DNA-Antikörper verwendet und der Anteil an niedermolekularer DNA durch Bestimmung der Peroxidaseabsorption bei 405 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind in Figur 2 wiedergegeben.

### Beispiel 3

Mittels eines Zytotoxizitätsassays wurde der toxische Effekt von Hyperforin bei verschiedenen Konzentrationen auf die in den Beispielen 1 und 2 verwendeten Tumorzelllinien untersucht. Hierzu wurde die Membranintegrität durch Trypanblau-Exklusion bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 wiedergegeben, wobei

die Angaben in % der unbehandelten Zellen erfolgen. Toxische Effekte waren kaum nachweisbar, dies bestätigt die spezifische Induktion von Apoptose durch Hyperforin.

Tabelle 1

Hyperforin (µg/ml)	Trypanblau-Exklusion (% der Zellen)		
	HT144	A431	Jurkat
0	100	100	100
2,5	100	100	100
5	100	100	100
10	100	100	100
20	100	95	100
40	90	90	100
80	80	90	100

#### Beispiel 4

Das folgende Beispiel belegt die apoptotische DNA-Fragmentierung durch Hyperforin und das bekannte Zytostatikum Taxol als Vergleichssubstanz. Die DNA-Fragmentierung wurde mittels DNA-Gelelektrophorese bestimmt. Als Tumorzelllinie wurde Jurkat (Leukämie) eingesetzt.

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden unbehandelt oder mit Hyperforin (40 µM) bzw. Taxol (10 µM) bei 37°C inkubiert. Apoptotische DNA-Fragmente wurden mittels NP 40-Lyse isoliert. Die Zellen wurden nach 4 Stunden bzw. nach 24 Stunden gewaschen und pelletiert. Das Zellpellet wurde für 10 Sek. mit Lysepuffer inkubiert (1% NP 40, Sigma; 20 mM EDTA, Sigma; 50 mM Tris-HCl,



Sigma). Die Lysate wurden mit 1% SDS (Sigma) gemischt, 2 h mit Rnase (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Boehringer) bei 56°C inkubiert und mit Proteinase K (Sigma) (2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) für 2 h bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 10 M Ammoniumacetat wurde die DNA mit 100% Ethanol bei -20°C gefällt und mittels Gelelektrophorese auf 1% Agarosegelen analysiert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigte sich, daß Hyperforin im Vergleich zu Taxol schneller Apoptose in Tumorzellen induziert, da diese bereits nach 4 Stunden voll ausgebildet war.

Tabelle 2

	Unbehandelte Zellen	Hyperforin (40 $\mu\text{M}$ )	Taxol (10 $\mu\text{M}$ )
4 Stunden	-	++	+
24 Stunden	-	++	++

++ = stark positiv  
 + = positiv  
 - = negativ

Klinikum der Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg

Patentansprüche

1. Verwendung von Hyperforin zur Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von Lymphomen und/oder Leukämien.
3. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von Metastasen, insbesondere Melanom-Metastasen.
4. Verwendung nach Anspruch 1 zur Behandlung von epithelialen Tumoren und/oder epithelialen Präkanzerosen.

Klinikum der Albert-Ludwigs-  
Universität Freiburg

Zusammenfassung

Hyperforin als Zytostatikum

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Hyperforin zur  
Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Präkanzerosen.

Fig. 1

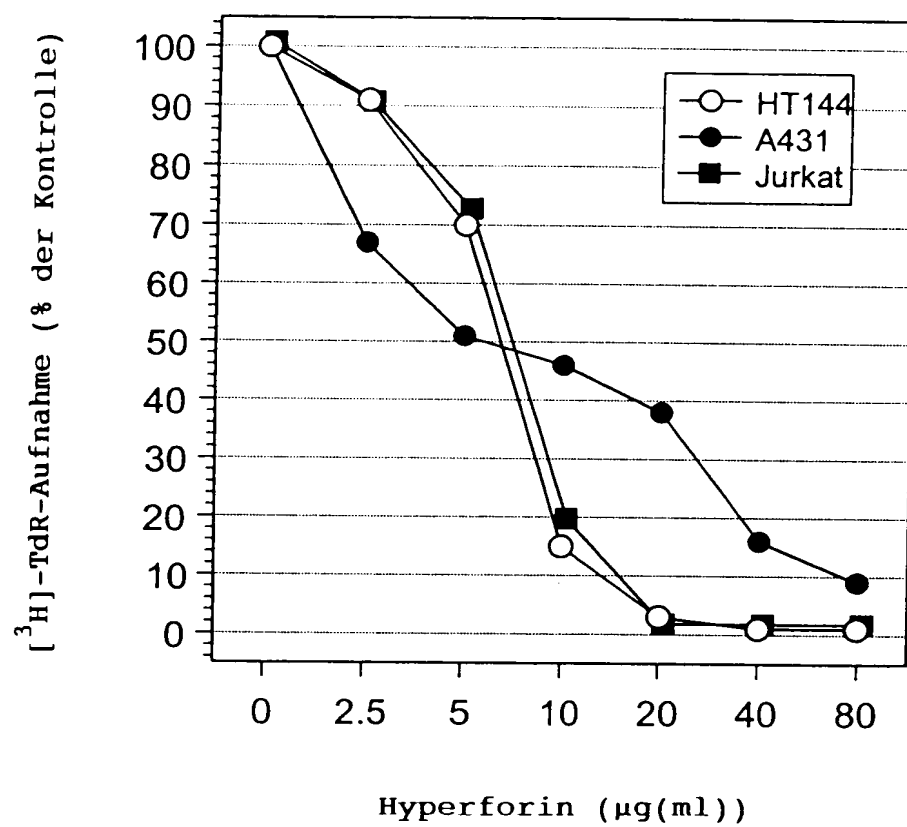


Fig. 2

